

CULTIVO *IN VITRO* DE *HOHENBERGIA PENDULIFLORA* (A. RICH.) MEZ. EN BIOREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL PARA LA OBTENCIÓN DE PROTEASAS.

Mayelin Mora, Aurora Pérez, Carol Carvajal, Martha Hernández, Reinaldo Trujillo.

Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.

INTRODUCCIÓN

El análisis de secuencias completas de varios genomas ha mostrado que aproximadamente el 2% de la información codificada por los genes son proteasas, lo que indica que es éste uno de los grupos funcionales de enzimas más grande y mejor caracterizado (Barrett *et al.*, 1998).

Las plantas de la familia *Bromeliaceae* son una fuente natural rica en cisteino proteasas. Estas enzimas son frecuentemente utilizadas en la industria alimentaria, biotecnológica y medico-farmacéutica. Estudios recientes informan del efecto antitumoral, antitrombótico y antimetastizante.

Aunque existen muchos estudios de aislamiento, purificación y caracterización de cisteino proteasas de plantas, quedan muchas fuentes naturales por explorar y se reconoce que el número de proteasas vegetales que han sido aisladas y caracterizadas es aún muy bajo, se han estudiado en este sentido menos del 1% de las especies vegetales conocidas. De ahí el marcado interés en la búsqueda de nuevas fuentes naturales y vías alternativas para la obtención de estas enzimas). *Hohenbergia penduliflora* (L.) Rich. Mez., planta epífita que habita los ecosistemas cubanos, es miembro de esta familia botánica. Pérez *et al.* (2006) demostraron la presencia de actividad proteolítica en extractos enzimáticos de varios órganos de esta planta

El material vegetal cultivado *in vitro* responde a los cambios provocados en el medio de cultivo, de allí que en las últimas décadas del siglo XX se comenzaron a aplicar los métodos de cultivo de tejidos *in vitro* para lograr la producción controlada de sustancias biológicamente activas (Heble, 1977). Estos sistemas controlados *in vitro* permiten sobre-expresar en las plantas productos del metabolismo, así como provocar su excreción directa al medio de cultivo sin que ocurra la destrucción de material vegetal

MATERIALES Y MÉTODOS

Generalidades.

Se colectaron las infrutescencias maduras de plantas adultas de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. que habitaban en el área protegida de la Loma de Cunagua, Ciego de Ávila. Se extrajeron las semillas de los frutos y se lavaron con abundante agua destilada y detergente. Finalmente se enjuagaron con abundante agua destilada.

La desinfección de las semillas se realizó con hipoclorito de sodio 2,0% (v/v) durante 20 minutos. Las semillas se implantaron en un medio cultivo que contenía: sales de Murashige y Skoog (1962), 100 mg/L de mio-inositol, 1 mg/L de tiamina-HCl y 30 g/L de sacarosa.

Para la multiplicación de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. se estudió el efecto de varias citoquininas, donde el mejor resultado se alcanzó al utilizar 8,8 µmol/L 6-benciladenina. Al evaluar diferentes concentraciones de ácido naftalenacético el mejor tratamiento fue utilizando 1,61 µmol/L. Estos resultados sirvieron de premisas para el siguiente experimento.

Efecto del manejo del explante en la multiplicación de brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

Para evaluar el efecto del manejo del explante en la multiplicación, se tomaron 40 brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez., de 1 cm de longitud, provenientes de semillas germinadas *in vitro*. A la mitad de estos explantes se les realizó un corte vertical en la base. Todos los explantes (con corte y sin corte en la base) se colocaron en un medio de cultivo basal que contenía: sales de Murashige y Skoog (1962), 100 mg/L de mio-inositol, 1 mg/L de tiamina-HCl, 30 g/L de sacarosa, 8,8 µmol/L 6-benciladenina y 1,61 µmol/L ácido

naftalenacético. Se evaluó el número de brotes por explantes luego de 30 días de cultivo. El mejor resultado sirvió de premisa para el siguiente experimento.

Efecto del tiempo de cultivo en la multiplicación de brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

Este experimento se realizó para estudiar el efecto del tiempo de cultivo en la multiplicación *in vitro* de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. Como explantes se usaron brotes provenientes de semillas germinadas *in vitro* que poseían de 1 cm de longitud a los cuales se les realizó un corte vertical en la base. Los brotes se colocaron en un medio de cultivo que contenía: sales de Murashige y Skoog (1962), 100 mg/L de inositol, 1 mg/L de tiamina-HCl, 30 g/L de sacarosa, 8,8 $\mu\text{mol/L}$ 6-benciladenina y 1,61 $\mu\text{mol/L}$ ácido naftalenacético. Estos se cultivaron por 15, 30, 45 y 60 días. Se utilizaron 20 explantes por tratamiento. Se evaluó el número de brotes y el coeficiente de multiplicación por explante.

Evaluación de la excreción de proteasas durante el crecimiento de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. en biorreactores de inmersión temporal (BIT).

Se colocaron brotes individuales de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez (5 brotes, 5 g aproximadamente), provenientes de la multiplicación *in vitro*, en biorreactores de inmersión temporal con 250 mL de medio de cultivo. Se utilizó el medio de cultivo propuesto por Pérez *et al.* (2003; 2004) que contenía: 4,2 $\mu\text{mol/L}$ de ácido giberélico, 90 g/L de sacarosa, 100% de las sales de Murashige y Skoog (1962), 1 mg/L de tiamina-HCl y 100 mg/L de mio-inositol. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,6 previo a la esterilización que se realizó en autoclave por 31 minutos. Los biorreactores de inmersión temporal se colocaron en la cámara de cultivo con temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$, luz blanca fluorescente ($37 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}$) y fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Se aplicaron 8 inmersiones/día de 4 minutos de duración. Las evaluaciones se realizaron a los 21 días de cultivo. Se usaron tres BIT. Se determinó la masa fresca inicial/BIT, masa fresca final/BIT y se calculó el incremento de este indicador.

El medio líquido proveniente de los BIT se filtró y se concentró 10 veces. Se cuantificó la concentración de proteínas del medio de cultivo por el método de Lowry *et al.* (1951). Se midió la absorbancia a 650 nm y el contenido de proteínas se expresó en mg/g de masa fresca referidos a una curva patrón de BSA. Se determinó la actividad enzimática del medio de cultivo por el método de Anson (1938). La actividad específica se calculó como el cociente de la actividad enzimática entre la concentración de proteínas (U/mg de proteínas).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del manejo del explante en la multiplicación de brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

La figura 4 muestra los resultados relacionados con el efecto del manejo del explante en la multiplicación de brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. Como se puede apreciar se obtuvo un mayor número de brotes (1,52 brotes) cuando se realizó el corte vertical en la base del explante.

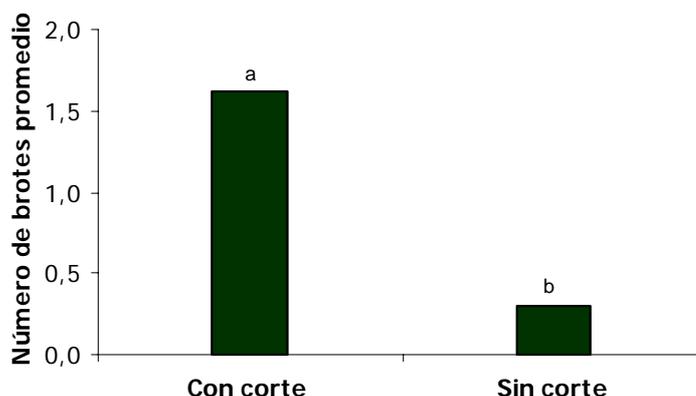


Figura 4. Efecto del manejo del explante en la multiplicación in vitro de brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. Medias con letras iguales no difieren (t-student, $p>0,05$).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este experimento en lo adelante se decidió realizar un corte vertical en la base de los explantes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. durante la fase de multiplicación.

Efecto del tiempo de cultivo en la multiplicación de brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

En la figura 5 aparecen los resultados relacionados con el efecto del tiempo de cultivo en la multiplicación de brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. Como se puede apreciar los mejores resultados en cuanto al número de brotes se obtuvo a los 30, 45 y 60 días sin diferencias significativas entre si (figura 5A).

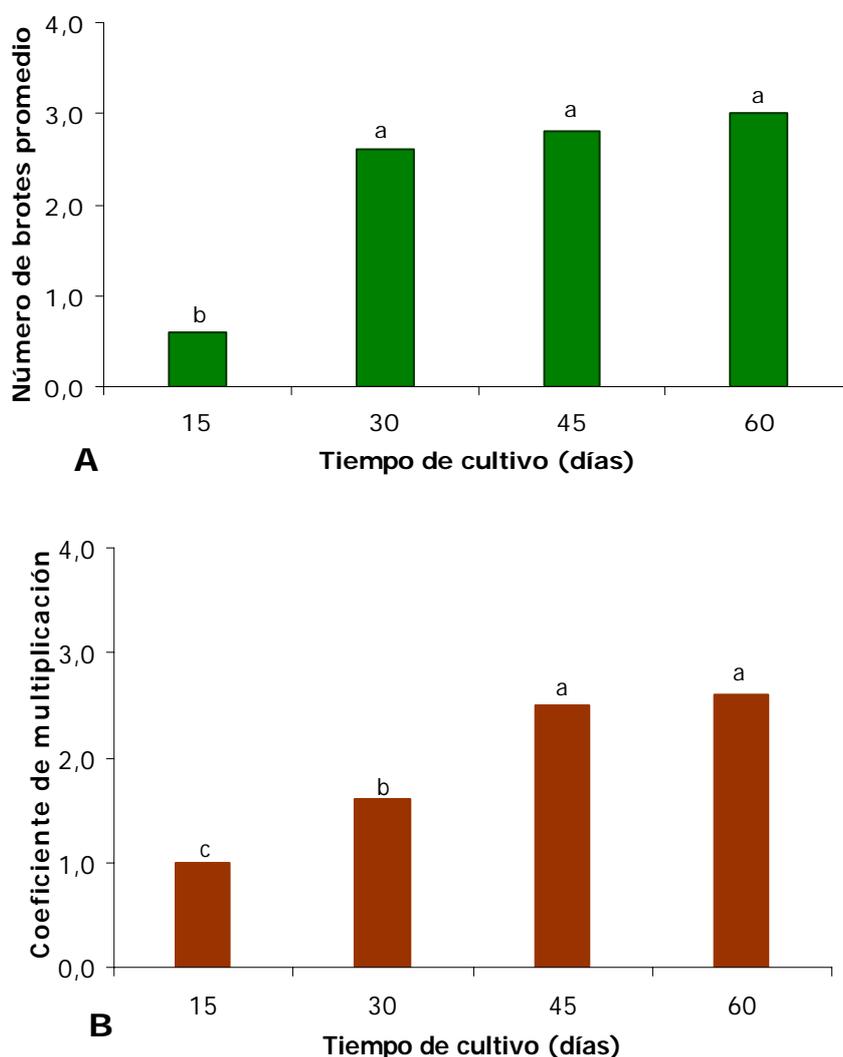


Figura 5. Efecto del tiempo de cultivo en la multiplicación de brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. **A)** Número de brotes, **B)** Coeficiente de multiplicación. Medias con letras iguales no difieren (ANOVA de un factor; Tukey, $p>0,05$).

Por su parte, el coeficiente de multiplicación de los brotes (figura 5B) fue mayor a los 45 y 60 días sin diferencias significativas entre si. El comportamiento observado para ambos

indicadores puede estar relacionado con que a los 30 días ya se encuentran formados los brotes pero su tamaño no alcanza la talla necesaria para poder independizarlo como explante. El hecho que el número de brotes y el coeficiente de multiplicación no se incrementa a los 60 días puede estar relacionado con el agotamiento de los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se decidió utilizar 45 días como tiempo de cultivo para la multiplicación de brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

Evaluación de la excreción de proteasas durante el crecimiento de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. en biorreactores de inmersión temporal.

Durante el crecimiento de brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. cultivados en biorreactores de inmersión temporal se notó incremento de la masa fresca (7,71 g/BIT). La determinación de los indicadores bioquímicos al medio de cultivo evidenció la presencia de proteasas en el mismo. La concentración de proteínas fue de 1,62 mg/g masa fresca y la actividad proteolítica de 0,16 U/ g masa fresca. Por su parte, la actividad específica resultó de 0,099 U/mg proteínas.

La excreción de proteasas al medio de cultivo por órganos cultivados *in vitro* ha sido poco abordada en la literatura. La mayoría de los trabajos hacen referencia al cultivo de suspensiones celulares para obtener compuestos provenientes tanto de metabolismo primario como secundario.

Pérez *et al.* (2003, 2004) estudiaron el efecto del tiempo de cultivo y el microambiente químico en la excreción de proteasas durante el cultivo de *Ananas comosus* (L.) Merr. en biorreactores de inmersión temporal. Estos autores obtuvieron un incremento de la masa fresca de 9,26 g/BIT, concentración de proteínas de 1,94 mg/g masa fresca y actividad proteolítica de 0,40 U/ g masa fresca. Por su parte, la actividad específica fue de 0,210 U/mg proteínas. Los resultados obtenidos para *Ananas comosus* (L.) Merr. fueron superiores a los de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. bajo las mismas condiciones de cultivo, esto puede estar relacionado con que los niveles de proteasas excretadas al medio de cultivo están estrechamente vinculados a la masa fresca y son propios para cada especie vegetal (Godlewski y Adamczyk, 2007).

Godlewski y Adamczyk (2007) estudiaron la capacidad que poseen los brotes y raíces de varias especies vegetales para excretar proteasas durante el cultivo *in vitro*. Estos autores notaron actividad proteolítica en la mayoría de los medios de cultivo evaluados pero los mayores valores los detectaron en los medios donde crecieron *Allium porrum*, *Zea mays* y *Helianthus annuus*. Además informaron que las proteasas excretadas en estos casos fueron de tipo cisteínicas.

Por su parte, Adamczyk *et al.* (2008) analizaron la excreción de proteasas durante el crecimiento *in vitro* de *Triticum aestivum* cv. Tacher con diferentes suplementos de nitrógeno. Estos autores sugirieron que las proteasas excretadas por las raíces al medio de cultivo participan activamente en la asimilación del nitrógeno orgánico por la vitroplanta. Adamczyk *et al.* (2009) realizaron la caracterización bioquímica de las proteasas excretadas al medio de cultivo durante el crecimiento *in vitro* de *Allium porrum* cv. Bartek e informaron la presencia de endoproteasas y de exoproteasas en el medio de cultivo.

Durante el crecimiento de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. en BIT se evidenció la excreción de proteasas al medio de cultivo en las condiciones evaluadas. Sin embargo sería interesante establecer el tiempo de cultivo y el microambiente químico óptimo para lograr mayores niveles de excreción. Además, resultaría novedosa la caracterización bioquímica y funcional de las proteasas excretadas al medio de cultivo.

CONCLUSIONES

1. La mayor multiplicación de los brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. se logró con 8,8 $\mu\text{mol/L}$ de 6-benciladenina y 1,61 $\mu\text{mol/L}$ de ácido naftalenacético.
2. El manejo del explante favoreció la multiplicación de los brotes de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez. El tiempo de cultivo adecuado fue de 45 días.
3. Se comprobó la excreción de proteasas al medio de cultivo durante el crecimiento de *Hohenbergia penduliflora* (A. Rich.) Mez.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamczyk, B., Godlewski, M., Smolander, A., Kitunen, V. 2009. Degradation of proteins by enzymes exuded by *Allium porrum* roots—A potentially important strategy for acquiring organic nitrogen by plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 919–925.
- Adamczyk, B., Godlewski, M., Zimny, J., Zimny, A. 2008. Wheat (*Triticum aestivum*) seedlings secrete proteases from the roots and, after protein addition, grow well on medium without inorganic nitrogen. *Plant Biology* 10(6): 718 – 724.
- Anson, M. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal Genetic Physiology* 22: 79.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. 1998. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London. pp. 546-555.
- Godlewski, M., Adamczyk, B. 2007. The ability of plants to secrete proteases by roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 45(9): 657-664.
- Heble, M.R. 1977. Plant tissue cultures, a source of natural products. En: C.K., Atal, B.M., Kapur (eds.) *Cultivation and utilization of medicinal and aromatic plants*. Regional Research Laboratory, Jammu, India. p. 510.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, A., Randall, R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Pérez, A., Nápoles, L., Hernández, M., Lorenzo, J.C. 2003. Protease excretion during pineapple micropropagation in temporary immersion bioreactors *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 39:311-315.
- Pérez, A; Carvajal, C; Torres, M.J; Martín, M.I; Pina, D; Trujillo, R; Lorenzo, J.C; Hernández, M. (2006). Actividad proteolítica de extractos enzimáticos obtenidos de plantas de la familia Bromeliaceae. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. vol11, No2.1028-4796p.